

Mutagênese Dirigida por Oligonucleotídeos: Bases Históricas e suas Aplicações em Engenharia Genética

Emprego da recombinação homóloga na edição de genomas



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 217

Mutagênese Dirigida por Oligonucleotídeos: Bases Históricas e suas Aplicações em Engenharia Genética

Maria José Vilaça de Vasconcelos
José Edson Fontes Figueiredo

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2017

Esta publicação está disponível no endereço:

<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges

Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Roberto dos Santos

Trindade, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: José Edson Figueiredo Fontes

1ª edição

Formato digital (2017)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Vasconcelos, Maria José Vilaça de.

Mutagenese dirigida por oligonucleotídeos: bases históricas e suas aplicações em engenharia genética / Maria José Vilaça de Vasconcelos, José Edson Fontes Figueiredo. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2017.

43 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 217).

1. Melhoramento genético. 2. Genética. 3. Genoma. I. Vasconcelos, Maria Jose Vilaça de. II. Figueiredo, José Edson Fontes. III. Título. IV. Série.

CDD 631.52 (21. ed.)

© Embrapa 2017

Autores

Maria José Vilaça de Vasconcelos

Farmacêutica/Bioquímica, Ph.D, Pesquisadora na Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, mariajose.vasconcelos@embrapa.br

José Edson Fontes Figueiredo

Biólogo/Bioquímico, Ph.D,, Pesquisador na Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 Km 45, Zona Rural, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, jose.edson@embrapa.br

Apresentação

A adaptação das culturas em um ambiente dinâmico impõe a necessidade de diversificação das estratégias de melhoramento genético visando o aumento da produtividade das culturas.

Na segunda metade do século XX, as mutações aleatórias no DNA, induzidas por agentes físicos e químicos, tiveram grande relevância no melhoramento vegetal como fonte de introdução de variabilidade genética em populações de plantas cultivadas.

A partir dos anos 1970, foram estabelecidos os pilares para a manipulação da molécula de DNA e a transformação de microrganismos, plantas e animais, possibilitando vislumbrar uma nova era para a manipulação genômica.

O desenvolvimento da técnica de mutagênese sítio-dirigida, baseada nos princípios da complementaridade de bases do DNA e na recombinação gênica, possibilitou a geração de alterações planejadas, precisas e eficientes em qualquer

genoma. Em decorrência dessa inovação, grandes avanços foram obtidos no melhoramento de diferentes espécies.

Nesse documento apresentamos os princípios da mutagênese sítio-dirigida, os avanços científicos e práticos do uso dessa técnica e as perspectivas do seu emprego para o melhoramento vegetal, com ênfase em milho e sorgo.

Antonio Alvaro Corsetti Purcino
Chefe-Geral
Embrapa Milho e Sorgo

Sumário

Introdução	7
Histórico	9
Recombinação Gênica	11
Recombinação Homóloga (RH) ou Geral	12
Recombinação não Homóloga ou “Ilegítima”	13
Recombinação Sítio-Específica	14
Recombinação Replicativa e não Replicativa	16
Estratégias de Engenharia Genética Empregando Recombinação Homóloga (RH)	18
Mecanismos da Mutagênese Dirigida por Oligonucleotídeos (ODM)	20
PCR e Montagem de Fragmentos de DNA sem Uso de Enzimas de Restrição	24
Método Isotérmico para Mutagênese	25
Métodos Usados de Introdução do Gene Mutado no Hospedeiro	26
Recombinação Homóloga Intragenômica	28
Aplicações da Mutagênese Dirigida por Oligonucleotídeos (ODM)	29
Referências	31

Mutagênese Dirigida por Oligonucleotídeos: Bases Históricas e suas Aplicações em Engenharia Genética

Maria José Vilaça de Vasconcelos¹

José Edson Fontes Figueiredo²

Introdução

No último século, os avanços nas áreas da herança genética, da bioquímica dos ácidos nucleicos e dos fenômenos naturais de recombinação gênica possibilitaram o surgimento de várias técnicas para manipulação de genes e genomas. Entre essas técnicas, Oligonucleotide Directed Mutagenesis (ODM) ou mutagênese sítio-dirigida criou novas alternativas para o melhoramento de microrganismos, animais e plantas.

ODM tem sido utilizada para corrigir ou fazer alterações em sítios específicos no DNA, permitindo gerar alterações na sequência de aminoácidos das proteínas, silenciamento gênico e modificações de sequências regulatórias, acarretando alterações no padrão da expressão gênica. Essa gama de possibilidades gerou grande quantidade de alterações em diferentes genomas visando o estudo das funções gênicas e obtenção de novas combinações de nucleotídeos para o melhoramento de qualquer organismo. Em algumas espécies de plantas, os métodos de cultivo de células e a regeneração

de plantas ainda representam entraves para utilização dessa técnica. Contudo, ODM tem sido utilizada com bastante sucesso para produzir milho, trigo, tabaco e colza resistentes a diferentes tipos de herbicida. Entre as perspectivas para o uso de ODM destacam-se o aumento da vida útil de variedades de plantas, tolerância aos estresses abióticos, resistência a pragas e doenças, melhoramento do desempenho agrônômico de cultivares, alteração do teor de ácidos graxos nas células e composição de aminoácidos das proteínas. Em milho, um dos principais objetivos consiste do melhoramento da qualidade nutricional, pela adição de aminoácidos essenciais às proteínas de reserva.

Até o início do século XX, as mutações espontâneas eram a única fonte de variação que podia ser explorada para o melhoramento genético de animais e plantas. Com os fundamentos da genética estabelecidos pelos trabalhos de Gregor Mendel com ervilha (1865), e os resultados de estudos sobre os efeitos das radiações ionizantes e de agentes químicos sobre os organismos, vislumbrou-se uma nova era para o melhoramento genético. Os trabalhos pioneiros de Stadler no final da década de 1920 marcaram o início do melhoramento de plantas baseado nas mutações induzidas (STADLER, 1928a, 1928b). Em razão do volume de variedades mutadas (aproximadamente 77) acumuladas ao longo de aproximadamente três décadas (AUERBACH; ROBSON, 1944), foi criada em 1964 a Divisão de Técnicas Nucleares na Agricultura (Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture) com o apoio da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) e da IAEA (International Atomic Energy Agency), possibilitando a criação de grupos de melhoramento de plantas por mutações induzidas em

diferentes países do mundo. No Brasil, foi criado, em 1964, o Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), sediado na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ/USP, que passou a coordenar e executar estudos realizados por diversos pesquisadores brasileiros trabalhando com diferentes culturas. Como resultado desse esforço, até o final do ano de 2009, o número de variedades comerciais, criadas por mutações induzidas, alcançou a marca de 3.088 em todo o mundo (FAO, 2011). Durante os últimos vinte anos, com o desenvolvimento da biologia molecular, diferentes técnicas foram incorporadas às pesquisas de mutagênese em plantas. Mutantes induzidos por meio dessa abordagem se tornaram parte fundamental dos estudos na área de genômica funcional (BISHOP et al., 2004; BOCK, 2001; KHARKWAL, 2011; FORSTER; SHU, 2011; OLADOSU et al., 2016; STADLER, 1928a, 1928b; STUCKEY; STORICI, 2013; SZTUBA-SOLINSKA et al., 2017; TERADA et al., 2007).

Histórico

As descobertas científicas que culminaram com o estabelecimento da função da molécula de DNA como portadora das informações necessárias para o funcionamento e herança celular tiveram início em 1869, quando o bioquímico suíço Johann Friedrich Miescher estudou os componentes químicos do núcleo de células linfóides isoladas do pus de bandagens de infecções (DAHLM, 2005). Miescher conseguiu identificar uma molécula composta de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e fósforo e demonstrou a existência de uma única ligação entre o fósforo e o nitrogênio presentes na molécula, a qual chamou de nucleína. Em 1881, o bioquímico alemão Albrecht Kossel determinou o caráter ácido da nucleína, que passou a ser chamada de ácido desoxirribonucleico ou DNA.

Na realidade, Kossel não sabia que suas amostras consistiam de uma mistura de moléculas de DNA e RNA e por isso isolou delas cinco nucleotídeos: adenina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) e uracil (U). Hoje sabemos que a timina é encontrada apenas no DNA e o uracil, no RNA (Kossel 1881).

Em 1928, Frederick Griffith descobriu o princípio genético da transformação ao demonstrar que extratos de linhagens virulentas da bactéria *Streptococcus pneumoniae* mortas pelo calor eram capazes de transformar linhagens avirulentas (-) em virulentas (+), portanto capazes de causar pneumonia em camundongos. Embora não tenha conseguido isolar o princípio transformante, Griffith supôs que alguma substância na capa de polissacarídeo das bactérias mortas tinha sido responsável pela transformação de bactérias avirulentas em virulentas (GRIFFITH, 1928).

Nos anos seguintes, os esforços de vários cientistas se concentraram na descoberta da natureza química dessa molécula cuja função permanecia desconhecida. Assim, entre os anos de 1943-1944, Oswald Avery, Colin MacLeod, e Maclyn McCarty conseguiram demonstrar que o princípio transformante nos experimentos de Griffith era o DNA. Em 1953, após reunirem informações de diferentes grupos independentes (Phoebus A. T. Levene, Erwin Chargaff, Rosalind Franklin e **Maurice Wilkins**), James Watson e Francis Crick conseguiram determinar a estrutura helicoidal do DNA (ALDRIDGE, 2003).

Após ter sido estabelecida a estrutura do DNA e o seu papel como portador de toda informação necessária para o funcionamento celular e hereditariedade, teve início uma

nova corrida visando determinar os efeitos de mutações aleatórias induzidas por agentes físicos e químicos no DNA, suas consequências nas funções celulares e o seu papel no melhoramento genético de plantas (SMITH 1958; GOODSPEEDE; OLSOM, 1928; DATTA, 2012).

No início da década de 1970 estudos de manipulação enzimática do DNA forneceram os pilares para o vasto campo da engenharia genética de seres vivos. Após quase meio século de avanços, a tecnologia do DNA recombinante tornou realidade a transgenia, a genômica e a possibilidade da clonagem reprodutiva (COHEN et al., 1972; JACKSON et al., 1972; SMITH; WELCOX, 1970).

Atualmente, em oposição às mutações aleatórias produzidas por agentes químicos e físicos, o desenvolvimento da técnica de melhoramento genético por mutagênese sítio dirigida, empregando os princípios da complementaridade de bases e recombinação gênica, tem possibilitado introduzir alterações planejadas, precisas e eficientes em qualquer genoma (PARCKER, 2017).

Recombinação Gênica

Na natureza, pelo menos quatro tipos diferentes de recombinação gênica foram identificados: recombinação geral ou homóloga (RH); não homóloga, também denominada heteróloga ou ilegítima; recombinação sítio-específico e recombinação replicativa. Os aspectos particulares de cada uma delas serão resumidamente descritos a seguir.

Recombinação Homóloga (RH) ou Geral

Esse tipo de recombinação ocorre entre moléculas de DNA com sequências de nucleotídeos muito similares, como, por exemplo, entre os cromossomos homólogos em organismos diploides. A RH, que pode acontecer ao longo de todo o genoma de um organismo, envolve a participação de enzimas recombinatórias. Como consequência, a RH aumenta a diversidade genética e desempenha papel crucial no reparo de danos físicos e químicos na molécula de DNA, mantendo a estabilidade do genoma (VAN GENT et al., 2001; WEST, 2003).

RH também pode gerar a transferência unilateral da informação genética resultando na conversão de um ou mais alelos de um dos cromossomos homólogos, na forma alélica do outro cromossomo (Figura 1). Essa variante da RH é também denominada de conversão gênica. Na recombinação entre dois cromossomos homólogos, sendo um deles portador dos genes A B D e o outro com a constituição a b d, pode resultar um novo arranjo a B d sem ocorrência de alteração no cromossomo parental A B D. Nessas situações, claramente ocorreu uma conversão do alelo b em B. A troca não foi recíproca, pois teria originado as combinações a B d / A b D, caso tivesse ocorrido recombinação dupla envolvendo as duas regiões cromossômicas envolvendo os genes A e B e B e D. Exemplos de conversão gênica intracromossômica têm sido amplamente descritos na literatura científica para genes de gama globulinas humana (CHEN et al., 2007; HOFFMANN et al., 2008).

Figura 1. Tipos de Recombinação homóloga. O pareamento entre os segmentos de DNA ocorre por alta homologia das

sequências de nucleotídeos entre os DNAs da célula e envolve a participação de enzimas específicas ou recombinases. Na figura, as letras maiúsculas representam os alelos selvagens e as letras minúsculas indicam as formas alélicas mutantes. O X indica o ponto de formação de quiasma entre as cromátides irmãs (apenas uma cromátide de cada cromossomo foi representada na figura).

Recombinação não Homóloga ou “Ilegítima”

Esse tipo de recombinação ocorre entre regiões cromossômicas não homólogas, ou seja, que não apresentam similaridade de sequências de nucleotídeos. A ocorrência de recombinação ilegítima é comum em segmentos cromossômicos translocados ou apresentando deleções gênicas e funciona como um sistema de reparo aleatório, de danos físicos no DNA (BUKHARI et al., 1977; ROTH et al., 1985; KUSANO et al., 1997). A existência de pequenas regiões de similaridade entre os pontos de quebra e o cromossomo íntegro pode gerar recombinação entre genes diferentes que estão localizados em pontos bastante distantes, muitas vezes separados por milhares de pares de bases, no mesmo cromossomo ou em cromossomos não homólogos (BUKHARI et al., 1977; WILSON, 2006). Os eventos de recombinação ilegítima podem gerar inversões, duplicações e deleções cromossômicas e pode ser de três tipos ou classes diferentes: 1- Recombinação sítio-específica, cujo rearranjo genômico ocorre por recombinação entre pequenas sequências homólogas de DNA; 2- Ligações de extremidades não homólogas ou rearranjos nos quais as novas sequências ligadas compartilham homologia envolvendo menos do que três pares de bases e não possuem homologia com sítios-específicos,

portanto aleatórias, 3- arranjos associados com elementos transponíveis (BUKHARI et al., 1977; WILSON, 2006) (Figura 2).

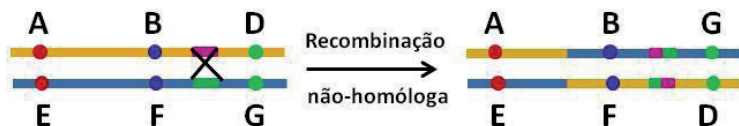


Figura 2. Recombinação não homóloga ou ilegítima. O DNA é inserido aleatoriamente no genoma bastando que existam algumas poucas bases complementares para realizar o pareamento das extremidades do DNA.

Recombinação Sítio-Específica

É aquela que ocorre entre sequências curtas de DNA contendo aproximadamente 12 a 24 pb divergentes nas moléculas parental e mutada envolvidas no processo de recombinação. O sistema de integração de alguns bacteriófagos (λ 1) no cromossomo bacteriano e o rearranjo dos genes de imunoglobulinas de vertebrados são exemplos de recombinação sítio-específica na natureza (Figura 3).

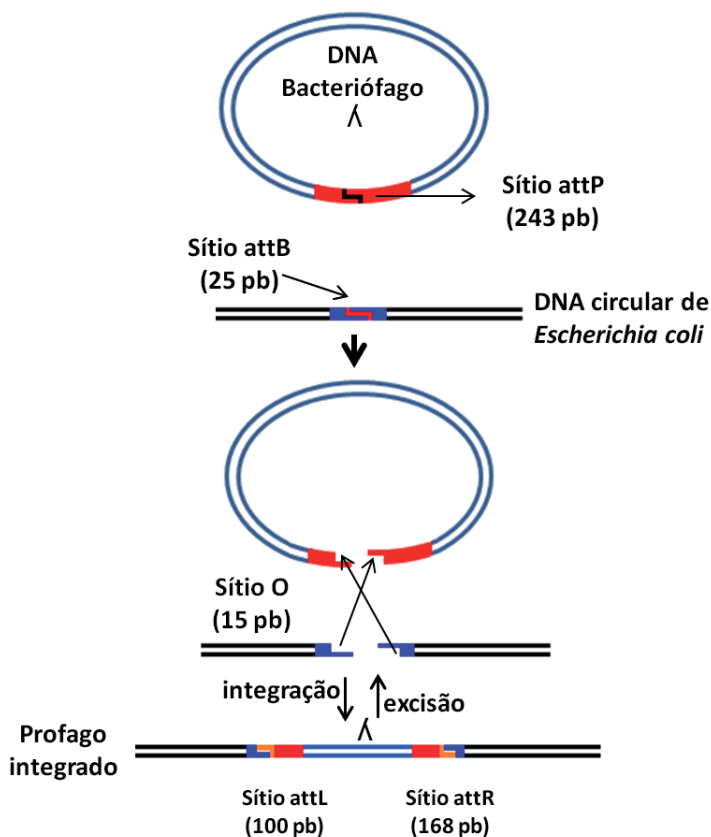


Figura 3. Recombinação sítio-específica. Na figura, **attP** (attachment Phage) corresponde ao sítio de integração do fago. Ele interage com o sítio **attB** (attachment Bacteria) da bactéria. A homologia entre os sítios **attP** e **attB** é apenas parcial, em uma região de 15 pb complementares em ambos os sítios (região O). Após a integração (profago) são gerados dois novos sítios (**attL** e **attR**). In vitro, nesse tipo de recombinação o vetor de clonagem e o inserto são digeridos por uma única enzima de restrição e a ligação entre inserto e o vetor é feita pela enzima DNA ligase.

Recombinação Replicativa e não Replicativa

Esses dois tipos de recombinação constituem o quarto mecanismo de recombinação, os quais geram novas cópias de um segmento de DNA (Figura 4).

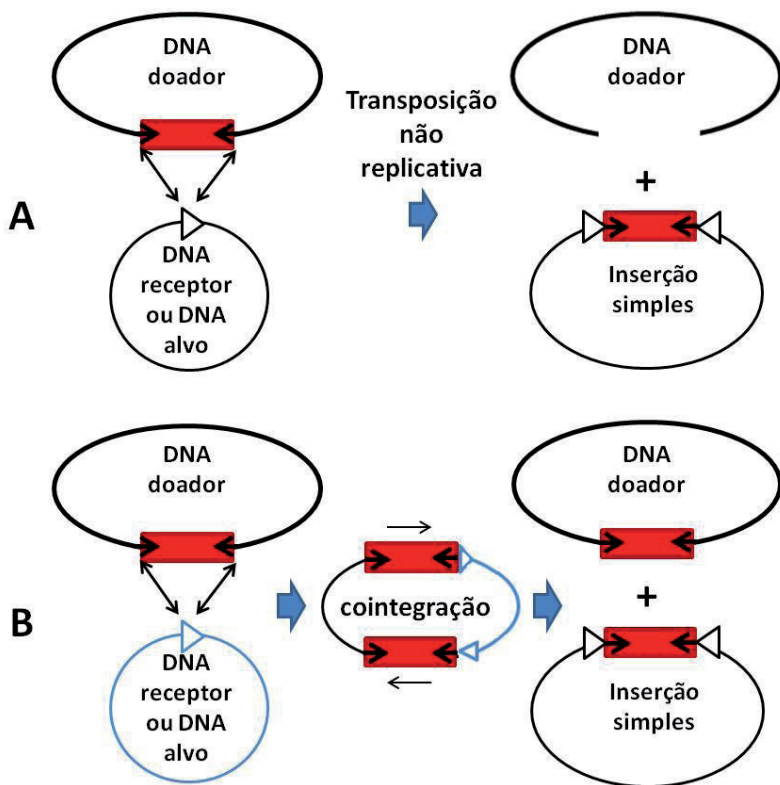


Figura 4. Recombinação não replicativa e replicativa. Na recombinação não replicativa (A), o elemento genético se move de um lugar para outro como uma entidade física e permanece inalterado; em (B), o elemento genético produz uma cópia fiel de si mesmo e integra em outro local, que pode ser um plasmídeo ou cromossomo.

Muitos elementos transponíveis utilizam o sistema de recombinação replicativa para gerar novas cópias de transposons que são inseridas em diferentes locais nos cromossomos (HALLET; SHERRATT, 1997) (Figura 5).

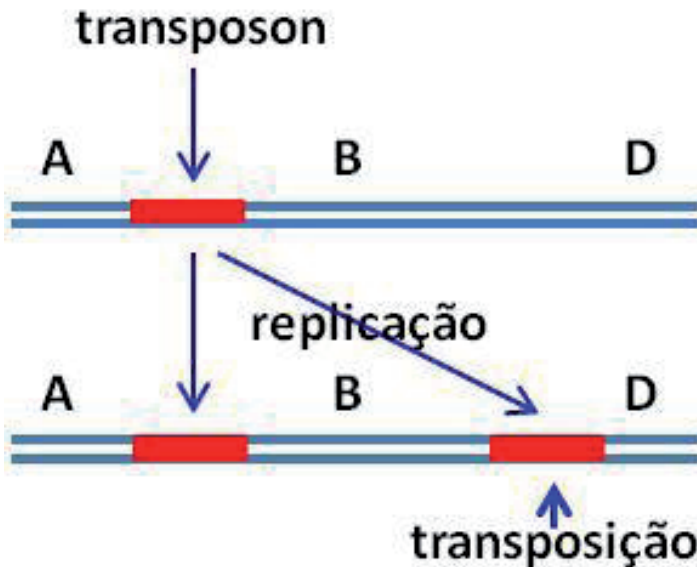


Figura 5. Transposição por recombinação replicativa. O transposon replicado é integrado em um local diferente no mesmo cromossomo ou em cromossomo diferente.

A tecnologia do DNA recombinante emprega outros tipos de recombinação baseados no corte do DNA com enzimas de restrição, inserção de sequência de DNA de interesse em vetores de clonagem, religação com a enzima DNA ligase e transformação do organismo hospedeiro. Nos casos em que o DNA é clonado em plasmídeo, bacteriófago ou qualquer vetor capaz de se replicar de modo autônomo no hospedeiro, o DNA recombinante se comportará de maneira independente, não

ligado ao cromossomo. Para que a transformação seja estável, o DNA clonado precisa ser integrado ao cromossomo do organismo hospedeiro.

Nas células, a recombinação homóloga funciona reparando a molécula de DNA danificada por fatores físicos ou químicos utilizando a fita intacta como molde. Dessa forma, a integridade da informação genética é restabelecida e preservada (POTEETE, 2001).

Estratégias de Engenharia Genética Empregando Recombinação Homóloga (RH)

Ao longo dos anos, foram desenvolvidas várias estratégias de engenharia genética utilizando o sistema de recombinação homóloga das células hospedeiras (GERLAI, 2016). Em bactérias e leveduras, mas não em plantas e animais, a integração do DNA pode ser feita com relativa facilidade por recombinação homóloga. Em células somáticas de mamíferos e plantas, que apresentam baixa frequência de RH, o emprego de métodos de clonagem gênica baseados nessa propriedade celular é muito restrito (KUWAYAMA, 2012). Outra limitação do uso de RH em engenharia genética de animais e plantas reside no fato de que, em muitos casos, a molécula de DNA introduzida se integra de forma aleatória nos cromossomos da célula hospedeira, e, embora produza transgênicos estáveis, estes poderão ser úteis ou não.

Mutagênese dirigida por oligonucleotídeos (ODM, do inglês, *oligonucleotide directed mutagenesis*) ou mutagênese sítio-específica é uma ferramenta utilizada em engenharia genética

para induzir alterações específicas e intencionais em sequências de nucleotídeos de DNAs alvo no genoma de microrganismos, plantas e animais (HO et al., 1989; HUTCHISON et al., 1978; LANDT et al., 1990; SMITH, 1982; THOMAS; CAPECCHI, 1987). ODM tem sido utilizada para corrigir ou fazer alterações sítio-específicas no genoma, alterar a sequência de aminoácidos das proteínas, eliminar a expressão de um gene (códon de parada ou mutações frameshift que provocam deslocamento do quadro de leitura para valores diferentes de múltiplos de três) e modificar a expressão gênica (mudanças nas sequências promotoras). Em uma proteína, pequenas mudanças específicas na sequência de aminoácidos dentro de um local crítico são, em muitos casos, responsáveis pelas diferenças no seu rendimento e alteração do fenótipo do organismo (YANG et al., 2014).

A tecnologia ODM, que teve seus fundamentos básicos estabelecidos nos anos de 1970, permite que mudanças sejam feitas na molécula de DNA, muitas vezes consistindo de um único nucleotídeo ou alterações extensas no genoma de interesse. Esse método foi desenvolvido por Hutchison et al. (1978), que conseguiram introduzir uma única troca de bases, de G para A, no gene *E* do bacteriófago ϕ X174 am3. Os autores também demonstraram que a mutação foi capaz de produzir um bacteriófago defeutivo para o gene mutado. Posteriormente, Ruvkun e Ausubel (1981) empregaram esse método para introduzir mutações gênicas em bactérias Gram-negativas. Em 1987, pesquisadores do laboratório de genética da Universidade de Wisconsin publicaram resultados de dois estudos independentes, utilizando ODM para corrigir mutações no gene HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) em células tronco de camundongo (DOETSCHMAN et al., 1987; THOMAS; CAPECCHI, 1987). Em 2007, os líderes desses estudos,

Mario Capecchi e Oliver Smithies, receberam o prêmio Nobel por suas pesquisas. Em seguida, as aplicações dessa tecnologia foram estendidas para a terapia gênica (GRAHAM; DICKSON, 2002; KREN et al., 1998; PIERCE et al., 2003; XU et al., 2015) e transformação de plantas (BEETHAM et al., 1999; DONG et al., 2006; HAAG et al., 1993; NOVAK; BRUNNER, 1992; OKUZAKI; TORIYAMA, 2004; SAUER et al., 2016; ZHU et al., 1999).

Mecanismos da Mutagênese Dirigida por Oligonucleotídeos (ODM)

O procedimento padrão para execução dessa técnica inclui a realização PCR e a clonagem do fragmento amplificado em um vetor (plasmídeo, bacteriófago, etc.). Os oligonucleotídeos iniciadores (primers), cujos tamanhos variam entre 20 e 30 nucleotídeos, são sintetizados com as modificações que se deseja incorporar ao gene alvo. Essas modificações consistem em substituições, deleções ou adições de bases. Durante o processo de amplificação os oligonucleotídeos contendo as mutações, são incorporados ao amplicom, alterando a sequência de nucleotídeos do gene original (WEINER et al., 1994). O uso de iniciadores longos com aproximadamente 200 nucleotídeos também é possível, mas apresenta uma série de limitações. Uma delas consiste no tamanho da mutação que se deseja introduzir que é limitada ao tamanho do iniciador a ser utilizado. Além disso, existe uma relação inversa entre o tamanho do oligonucleotídeo e o produto amplificado por PCR (JAJESNIAK; WONG, 2015). Por último, oligonucleotídeos longos não são muito eficientes para amplificar regiões do genoma ricos em G-C ou que formam estruturas secundárias (HO et al., 1989; REIKOFSKI; TAO, 1992).

O princípio do funcionamento da técnica de mutagênese sítio-dirigida se baseia na propriedade de hibridização de moléculas de DNA por homologia do pareamento de bases. Dessa forma, pequenos oligonucleotídeos complementares ao DNA de interesse, mas contendo uma ou algumas diferenças na composição das bases nitrogenadas, podem ser sintetizados e empregados para gerar mutações sítio-dirigidas (Figura 6). Em seguida, o oligonucleotídeo é introduzido no interior do núcleo celular e após hibridização por homologia e reparo da cadeia original de DNA a mutação desejada é incorporada ao genoma hospedeiro, o oligonucleotídeo é degradado e a mutação desejada será transmitida às gerações seguintes. O resultado final do processo é a alteração ou melhoramento de um ou mais caracteres do organismo mutado (ERIKSSON; SCHIEMANN, 2016).

A tecnologia ODM possui muitas variações, entre as quais a mais simples envolve uma sequência curta de DNA de cadeia simples (oligonucleotídeo) sintetizado quimicamente a partir de uma sequência conhecida (ELLIS et al., 2001). O oligonucleotídeo é introduzido nas células por processo químico mediado por polietilenoglicol, eletroporação ou biobalística e no interior da célula, o oligonucleotídeo contendo a alteração desejada hibridiza com a sequência homóloga do DNA alvo, e por recombinação introduz a alteração desejada no DNA alvo. Apenas uma única incompatibilidade de pareamento entre nucleotídeos mutados e nativos é suficiente para ativar o sistema celular de reparo do DNA e gerar mudanças na sequência de DNA alvo. Contudo, essa forma muito simples de ODM utilizando DNA de cadeia simples provou ser ineficiente por causa do baixo rendimento na seleção das formas mutantes. Na realidade, após a transformação, o que se tem

é uma mistura, tanto do molde não mutado original como da cadeia mutante, produzindo uma população mista de progênies mutantes e não mutantes. Além disso, o DNA molde é metilado enquanto a cadeia mutante não é. Consequentemente, os mutantes podem ser contra-selecionados em razão da presença de um sistema de reparo que favorece o DNA molde metilado, resultando em menos mutantes. Por conseguinte, outros modelos de oligonucleotídeos foram desenvolvidos compreendendo misturas de RNA e DNA de cadeia simples, RNA de cadeia única, ou oligonucleotídeos formando hélice tripla.

Melhoramento significativo no método de mutagênese dirigida foi obtido com o desenvolvimento de técnicas que possibilitam a síntese comercial de longas cadeias sintéticas de DNA dupla fita (dsDNA) (PENG PUMKIAT et al., 2016; SOBOLEWSKI et al., 2011). dsDNA com mais de 3 kb, incorporando as mutações desejadas, são compatíveis, tanto com os métodos clássicos de mutagênese (PCR, clonagem por enzimas de restrição) quanto com os novos métodos que utilizam longas cadeias de DNA sintético (montagem isotérmica). Dentre as vantagens dessa nova abordagem destaca-se a economia de tempo para produzir sequências selvagens e mutadas dos genes de interesse. A um custo razoável, os cientistas podem desenhar qualquer tipo de sequência e receber suas solicitações em curto espaço de tempo. Outra vantagem do método consiste do fato de que a síntese da molécula de DNA não requer a existência de um DNA molde.

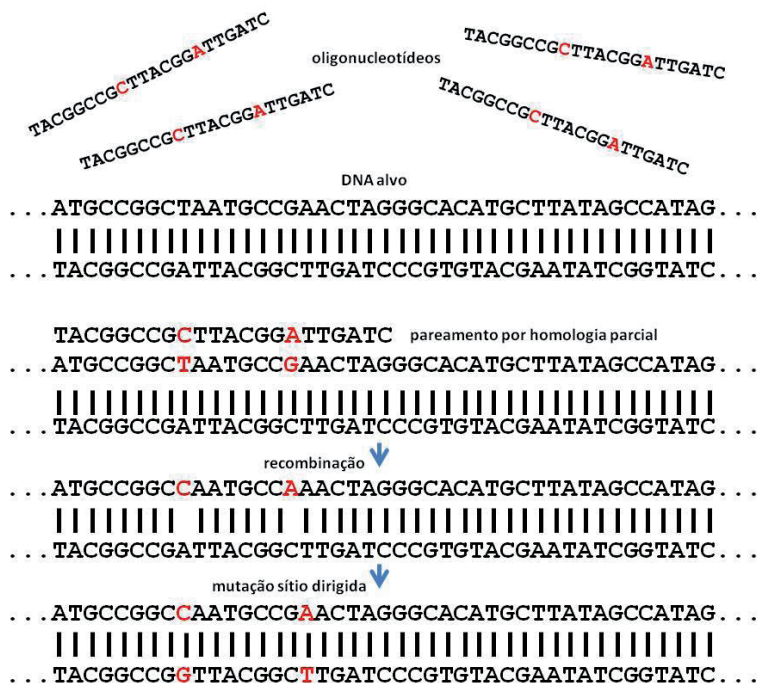


Figura 6. Princípio da técnica de mutagênese sítio-dirigida. Oligonucleotídeos sintetizados, contendo as alterações desejadas (destacados na cor vermelha), são introduzidos nas células. Após o pareamento por homologia parcial e recombinação homóloga, os oligonucleotídeos iniciadores são degradados pelas células hospedeiras e as alterações sítio-dirigidas são incorporadas no DNA alvo e transmitidas às gerações seguintes.

O uso de dsDNA para mutagênese empregando PCR pode ser exemplificado pela clonagem sem o uso de enzimas de restrição (RF, do inglês, *restriction-free*) descrito por Unger et al. (2010). Na abordagem RF, os iniciadores são substituídos por longas sequências de DNA em que as extremidades 5' contem

sequências homólogas ao sítio de clonagem do vetor (Figura 7). Nesse caso, o procedimento de linearização do vetor é desnecessário e o inserto pode ser integrado em qualquer parte do vetor. Uma grande vantagem dessa técnica consiste no fato de que o vetor copiado pela célula bacteriana é metilado e o vetor empregado na transformação não apresenta metilação. Dessa forma, muito tempo é poupado na etapa de seleção dos clones positivos, pois vetores negativos, metilados, podem ser removidos pelo tratamento com a enzima *DpnI*.

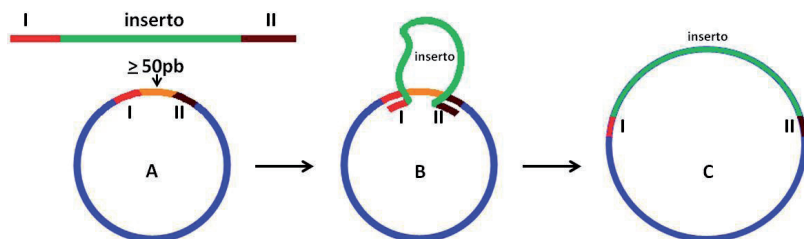


Figura 7. Clonagem livre de PCR e enzimas de restrição. Em **A**, o inserto de DNA dupla fita que será clonado possui regiões de homologia com o vetor, representado por I e II, distantes entre si por no mínimo 50 pb. O inserto pareia com o vetor na região de homologia (**B**), e após recombinação e reparo ocorre sua integração ao vetor de clonagem (**C**).

PCR e Montagem de Fragmentos de DNA sem Uso de Enzimas de Restrição

A maioria dos projetos envolvendo DNA recombinante precisa lidar com a necessidade de se ligarem dois ou mais fragmentos de DNA. Em muitos casos, isso não pode ser feito simplesmente com a digestão dos fragmentos com enzimas de restrição e uso de adaptadores, ou sem que nucleotídeos

indesejados sejam incorporados nas junções das sequências ligadas (SHEVCHUK et al., 2004). Além disso, os protocolos para sobreposição de sequências amplificadas baseados em PCR apresentam sérias limitações quanto ao tamanho do DNA a ser clonado, que é restrito a aproximadamente 3,4 kilobases (Kb) (HO et al., 1989; PONT-KINGDON, 1997; KUWAYAMA et al., 2002).

Entre as vantagens da mutagênese por dsDNA podemos destacar a possibilidade de adição de quantidades muito grandes de DNA, tais como novos genes, promotores, sequências regulatórias, etc. Esse procedimento elimina ou reduz a necessidade de se fazer mutagênese sequencial, preservando a sequência de interesse livre de erros incorporados pela polimerase durante os ciclos de PCR, de ocorrência comum quando se utiliza primers (oligonucleotídeos iniciadores) e PCR de fragmentos muito longos de DNA (UNGER et al., 2010; GIBSON et al., 2009).

Método Isotérmico para Mutagênese

O mecanismo de mutagênese isotérmico possibilita a montagem de um ou mais fragmentos lineares de DNA, tais como plasmídeo e inserto que possuem extremidades homólogas entre si (GIBSON et al., 2009). O nome desse método de mutagênese origina-se do fato de que múltiplas reações podem ser feitas em um único frasco em uma mesma temperatura de incubação. Nesse processo, os fragmentos de DNA são misturados e as extremidades coesivas são criadas por atividade de uma exonuclease. Os fragmentos originados anelam entre si por complementariedade de

bases determinando a orientação precisa dos fragmentos. Em seguida, a enzima polimerase preenche as lacunas (gaps) nas duas ou mais sequências e a enzima DNA ligase sela as duas cadeias (Figura 8). Esse procedimento cria a possibilidade de ligação perfeita entre dois ou mais fragmentos de DNA sem que ocorra introdução de nucleotídeos indesejados nas construções. O plasmídeo empregado como vetor pode ser linearizado por enzimas de restrição ou PCR, e possibilita a integração de inserto em qualquer ponto do vetor, independentemente da existência de sítios de restrição. Contudo, o maior benefício da linearização do vetor por PCR está relacionado com o fato de que qualquer plasmídeo recircularizado sem a presença do inserto pode ser removido pela digestão com a enzima *DpnI*, reduzindo o tempo de *screening* pela eliminação de falsos clones (GIBSON et al., 2009).

Métodos Usados de Introdução do Gene Mutado no Hospedeiro

O produto de PCR empregando oligonucleotídeo homólogo ao DNA alvo e contendo alterações planejadas é clonado em um vetor, introduzido nas células e incorporado ao genoma pelo mecanismo intracelular de reparo. Os oligonucleotídeos podem ser desenhados para produzir substituições de nucleotídeos sítio-específicos, inserções ou deleções em um gene alvo.

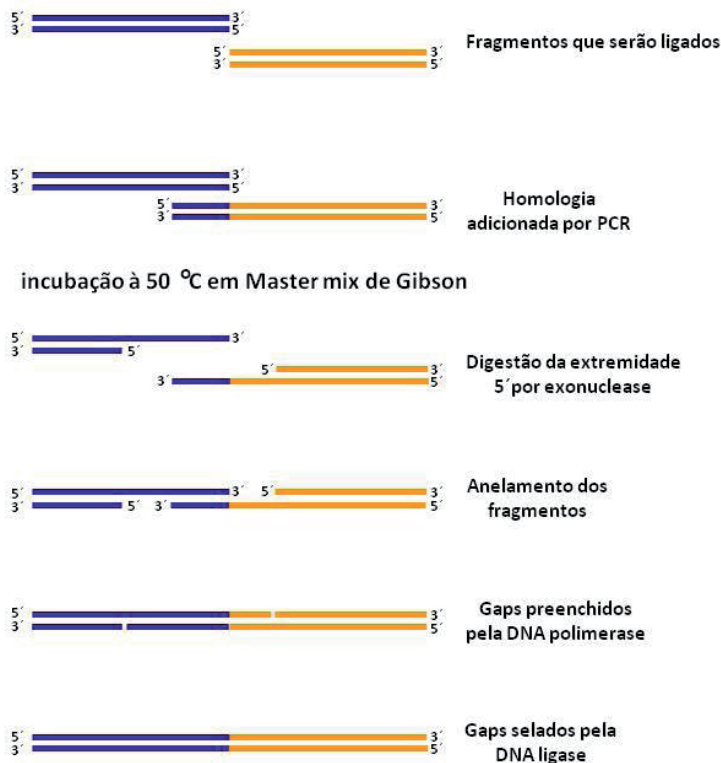


Figura 8. Mecanismo de mutagênese isotérmica. Ver descrição no texto.

A inserção de mutações cromossômicas precisas foi estabelecida como padrão para análise da função de genes bacterianos. Os protocolos publicados são geralmente baseados em dois ciclos sucessivos de recombinação: (i) no primeiro passo, a integração de um marcador que pode ser selecionado positivamente (por exemplo, um gene de resistência a antibióticos); (II) seleção para perda de marcador ("counter selection") no último passo de recombinação (REYRAT et al., 1998). Alguns dos métodos "counter selection" funcionam em conjunto com a recombinação dos fragmentos

de DNA sintéticos evitando o tedioso requisito para a mutagênese e clonagem à base de PCR que visa gerar alelos mutantes para a segunda etapa de recombinação.

Recombinação Homóloga Intragenômica

Recentemente, o emprego de recombinação homóloga intragenômica ou IGHR (do inglês, *Intra-Genomic Homologous Recombination*) integra os métodos de melhoramento tradicional e transformação genética, com o uso de nucleases específicas desenhadas para cada tipo de finalidade. A grande vantagem dessa estratégia consiste no fato de possibilitar a conversão de genes não ligados, portanto localizados em cromossomos diferentes ou separados por milhares de pares de bases em um mesmo cromossomo que se comportam como unidades independentes, em genes ligados (Figura 9), criando verdadeiros cassetes gênicos contendo blocos únicos de genes, que facilitam o melhoramento convencional por causa da exclusão da necessidade de seleção e cruzamentos entre progênie segregantes para diferentes caracteres (KUMAR et al., 2016a).

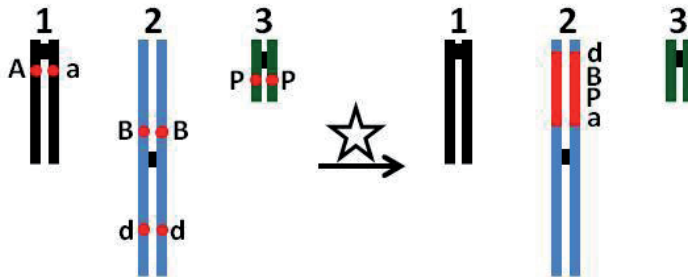


Figura 9. Recombinação homóloga intragenômica. Na figura está sendo representado um conjunto de três cromossomos de uma espécie hipotética indicados pelos números de 1 a 3. As letras representam os genes alvo que serão agrupados em um cassete. A seta indica a direção das reações e a “estrela” indica o evento de recombinação homóloga mediado por nucleases engenheiradas (ZFN, TALEN ou CRISP) que são ligadas às extremidades do cassete gênico. Ao final das manipulações, um conjunto de genes não ligados (**A, B, d e P**) ou que se comportam como unidades segregantes independentes (**B e d**) são ligados entre si (**dBPa**) de maneira adjacente em um único cromossomo.

Aplicações da Mutagênese Dirigida por Oligonucleotídeos (ODM)

Entre as aplicações dessa técnica, destacam-se a análise da estrutura e função de proteínas e ácidos nucleicos (DNA e RNA) e a engenharia de moléculas proteicas para aperfeiçoar suas atividades ou até mesmo para criar novas funções celulares (RAO, 2008; SAIKA et al., 2011; TURANLI-YILDIZ et al., 2012).

O método ODM para gerar alterações em sequências de DNA permite que os pesquisadores investiguem os efeitos das mudanças de nucleotídeos na molécula, tais como

polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), ou para inserir ou eliminar sítios específicos em um gene, por exemplo, o local de ligação de uma proteína regulatória ou mesmo um sítio de restrição. A mutagênese dirigida pode ser utilizada para criar uma biblioteca gênica variante para pesquisa visando determinar a sequência de nucleotídeos ideal para ser usada em estudos específicos. Essa técnica tem sido utilizada para os organismos como as bactérias e leveduras, em mamíferos e, no futuro, terapia genética.

Em várias espécies vegetais, o potencial da tecnologia ODM tem sido pouco explorado em razão de diferentes motivos, tais como: a relativa ineficiência dos métodos de transformação atualmente disponíveis para introduzir o DNA exógeno no interior das células (polietilenoglicol, eletroporação, biobalística, vesículas de lipídios catiônicos); o baixo índice de integração dos genes “engenheirados” nos cromossomos da planta hospedeira; a baixa regeneração de plantas; e a existência de genótipos recalcitrantes (HIMMEL et al., 2007; KUMAR et al., 2016a, 2016b; YODER; GOLDSBROUGH, 1994).

Os primeiros relatos da utilização de ODM no melhoramento vegetal surgiram no final dos anos 1990 (CLEMENTE; MÁRQUEZ, 1999; HORNUNG et al., 1999; TOROSER et al., 1999; VITRY et al., 1999). Entre as aplicações comerciais da ODM destaca-se a produção de variedades de plantas, tais como milho, trigo, tabaco e colza resistentes aos herbicidas. No melhoramento do milho, uma abordagem importante consiste em adicionar aminoácidos essenciais às proteínas de armazenamento para aumentar o seu valor nutritivo (FORSTER; SHU 2011; HAIQUAN et al., 2017; HSIEH; VAISVILA, 2013). Essa técnica também tem sido utilizada com bastante sucesso

para estudos de genética reversa em que determinado gene é silenciado (*knock out*) com o objetivo de descobrir sua função celular (ERIKSSON; SCHIEMANN, 2016). Como exemplos de áreas que podem ter seu uso potencializado pela técnica ODM destacam-se: o aumento da vida útil de variedades de plantas, tolerância aos estresses abióticos, resistência a pragas, melhoramento do desempenho agrônômico, alteração do teor de ácidos graxos nas células e aminoácidos das proteínas.

Referências

- ALDRIDGE, S. **The DNA story**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2003. Disponível em: <<https://www.chemistryworld.com/news/the-dna-story/3003946.article>>. Acesso em: 1 jul. 2017.
- AUERBACH, C.; ROBSON, J. M. Production of mutations by allyl isothiocyanate. **Nature**, London, v. 154, n. 3898, p. 81, 1944.
- BEETHAM, P. R.; KIPP, P. B.; SAWYCKY, X. L.; ARNTZEN, C. J.; MAY, G. D. A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene specific mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 15, p. 8774-8778, 1999.
- BISHOP, A.; FIELDING, S.; DYSON, P.; HERRON, P. Systematic insertional mutagenesis of a Streptomyces genome: a link between osmoadaptation and antibiotic production. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 14, n. 5, p. 893-900, 2004.
- BOCK, R. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 312, n. 3, p. 425-438, 2001.

BUKHARI, A. I.; SHAPIRO, J. A.; ADHYA, S. L. (Ed.). **DNA insertion elements, plasmids and episomes**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1977.

CHEN, J. M.; COOPER, D. N.; CHUZHANOVA, N.; FÉREC, C.; PATRINOS, G. P. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 8, p. 762-775, 2007.

CLEMENTE, M. T.; MÁRQUEZ, A. J. Site-directed mutagenesis of Glu-297 from the α -polypeptide of *Phaseolus vulgaris* glutamine synthetase alters kinetic and structural properties and confers resistance to L-methionine sulfoximine. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 40, n. 5, p. 835-845, 1999.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 69, n. 8, p. 2110-2114, 1972.

DAHLM, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. **Developmental Biology**, San Diego, v. 278, n. 2, p. 274-288, 2005.

DATTA, S. K. Success story of induced mutagenesis for development of new ornamental varieties. **Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability**, v. 6, n. 1, p. 15-26, 2012.

DOETSCHMAN, T.; GREGG, R. G.; MAEDA, N.; HOOPER, M. L.; MELTON, D. W.; THOMPSON, S.; SMITHIES, O. Targeted

correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. **Nature**, London, v. 330, n. 6148, p. 576-578, 1987.

DONG, C.; BEETHAM, P. R.; VINCENT, K.; SHARP, P. Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, p. 457-465, 2006.

ELLIS, H. M.; YU, D.; DITIZIO, T.; COURT, D. L. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, p. 6742-6746, 2001.

ERIKSSON, D.; SCHIEMANN, J. **Oligonucleotide-directed mutagenesis: matchmaking and single mismatching**. Brussels: European Plant Science Organization, 2016. Crop Genetic Improvement Techniques. Fact sheet. Disponível em: <<http://www.epsoweb.org/file/2182>>. Acesso em: 13 out. 2017.

FAO. **Plant mutation breeding and biotechnology**. Roma, 2011.

FORSTER, B. P.; SHU, Q. Y. Plant mutagenesis in crop improvement: basic terms and applications. In: SHU, Q. Y.; FORSTER, B. P.; NAKAGAWA, H. (Ed.). **Plant mutation breeding and biotechnology**. Roma: FAO, 2011. p. 9-20.

GERLAI, R. Gene targeting using homologous recombination in embryonic stem cells: the future for behavior genetics? **Frontiers in Genetics**, v. 7, p. 1-10, 2016.

GIBSON, D. G.; YOUNG, L.; CHUANG, R. Y.; VENTER, J. G.; HUTCHISON, C. A.; SMITH, H. O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, New York, v. 6, n. 5, p. 343-345, 2009.

GOODSPEED, T. H.; OLSON, A. R. Progenies from X-rayed sex cells of tobacco. **Science**, Washington, v. 67, n. 1724, p. 46, 1928.

GRAHAM, I. R.; DICKSON, G. Gene repair and mutagenesis mediated by chimeric RNA–DNA oligonucleotides: chimeraplasty for gene therapy and conversion of single nucleotide polymorphisms (SNPs). **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1587, n. 1, p. 1-6, 2002.

GRIFFITH, F. *The significance of pneumococcal types*. **Journal of Hygiene, London**, v. 27, n. 2, p. 113-159, 1928.

HAAG, E.; EATON-RYE, J. J.; RENGGER, G.; VERMAAS, W. F. J. Functionally important domains of the large hydrophilic loop of CP47 as probed by oligonucleotide-directed mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Biochemistry**, Washington, v. 32, n. 16, p. 4444-4454, 1993.

HAIQUAN, Y.; LI, J.; DU, G.; LIU, L. Microbial production and molecular engineering of industrial enzymes. In: BRAHMACHARI, G.; DEMAINE, A. L.; ADRIO, J. L. **Biotechnology of microbial enzymes**. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 151-165.

HALLET, B.; SHERRATT, D. J. Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, n. 2, p. 157-178, 1997.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; FOUST, T. D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, Washington, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HO, S. N.; HUNT, H. D.; HORTON, R. M.; PULLEN, J. K.; PEASE, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 51-59, 1989.

HOFFMANN, F. G.; OPAZO, J. C.; STORZ, J. F. Rapid rates of lineage-specific gene duplication and deletion in the α -globin gene family. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 3, p. 591-602, 2008.

HORNUNG, E.; WALTHER, M.; KÜHN, H.; FEUSSNER, I. Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 96, n. 7, p. 4192-4197, 1999.

HSIEH, P. C.; VAISVILA, R. Protein engineering: single or multiple site-directed mutagenesis. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 978, p. 173-186, 2013.

HUTCHISON, C. A.; PHILLIPS, S.; EDGELL, M. H.; GILLAM, S.; JAHNKE, P.; SMITH, M. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 253, n. 18, p. 6551-6560, 1978.

JACKSON, D. A.; SYMONS, R. H.; BERG, P. *Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 69, n. 10, p. 2904-2909, 1972.

JAJESNIAK, P.; WONG, T. S. Quickstep-cloning: a sequence-independent, ligation-free method for rapid construction of recombinant plasmids. **Journal of Biological Engineering**, v. 18, n. 9, p. 1-10, 2015.

KHARKWAL, M. C. A brief history of plant mutagenesis. In: SHU, Q. Y.; FORSTER, B. P.; NAKAGAWA, H. (Ed.). **Plant mutation breeding and biotechnology**. Roma: FAO, 2011. p. 21-30.

KREN, B. T.; BANDYOPADHYAY, P.; STEER, C. J. In vitro site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides. **Nature**, London, v. 4, n. 3, p. 285-290, 1998.

KUMAR, S.; BARONE, P.; SMITH, M. Gene targeting and transgene stacking using intra genomic homologous recombination in plants. **Plant Methods**, v. 12, p. 1-7, 2016a.

KUMAR, S.; WORDEN, A.; NOVAK, S.; LEE, R.; PETOLINO, J. F. A trait stacking system via intra-genomic homologous recombination. **Planta**, Berlin, v. 244, n. 5, p. 1157-1166, 2016b.

KUSANO, K.; SAKAGAMI, K.; YOKOCHI, T.; NAITO, T.; TOKINAGA, Y.; UEDA, E.; KOBAYASHI, I. A new type of illegitimate recombination is dependent on restriction and homologous

interaction. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 17, p. 5380-5390, 1997. KUWAYAMA, H. Enhancement of homologous recombination efficiency by homologous oligonucleotides. In: GOWDER, S. (Ed.). **Biochemistry, genetics and molecular biology, cell interaction**. Rijeka: InTech, 2012. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/cell-interaction/enhancement-of-homologous-recombination-efficiency-by-homologous-oligonucleotides>>. Acesso em: 16 maio 2017.

KUWAYAMA, H.; OBARA, S.; MORIO, T.; KATOH, M.; URUSHIHARA, H.; TANAKA, Y. PCR mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 1-5, 2002.

LANDT, O.; GRUNERT, H. P.; HAHN, U. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. **Gene**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 125-128, 1990.

NOVAK, F. J.; BRUNNER, H. Plant breeding: induced mutation technology for crop improvement. **IAEA Bulletin**, n. 4, p. 25-33, 1992.

OKUZAKI, A.; TORIYAMA, K. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, n. 7, p. 509-512, 2004.

OLADOSU, Y.; RAFII, M. Y.; ABDULLAH, N.; HUSSIN, G.; RAMLI, A.; RAHIM, H. A.; MIAH, G.; USMAN, M. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 1, p. 1-16, 2016.

PARCKER, H. **Site-directed mutagenesis**: improvements to established methods. Disponível em: <<https://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/core-concepts/decoded/2015/06/30/site-directed-mutagenesis-improvements-to-established-methods>>. Acesso em: 28 jun. 2017.

PENGPUMKIAT, S.; KOESDJOJO, M.; ROWLEY, E. R.; MOCKLER, T. C.; REMCHO, V. T. Rapid synthesis of a long double-stranded oligonucleotide from a single-stranded nucleotide using magnetic beads and an oligo library. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 3, p. 1-10, 2016.

PIERCE, E. A.; LIU, Q.; IGOUCHEVA, O.; OMARRUDIN, R.; MA, H.; DIAMOND, S. L.; YOON, K. Oligonucleotide-directed single-base DNA alterations in mouse embryonic stem cells. **Gene Therapy**, Basingstoke, v. 10, n. 1, p. 24-33, 2003.

PONT KINGDON, G. Creation of chimeric junctions, deletions, and insertions by PCR. In: BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. (Ed.). **PCR Protocols**. Totowa: Humana Press, 1997. p. 167-172. (Methods in Molecular Biology, 67).

POTEETE, A. R. What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 201, n. 1, p. 9-14, 2001.

RAO, A. J. The outlook for protein engineering in crop improvement. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 147, n. 1, p. 6-12, 2008.

REIKOFSKI, J.; TAO, B. Y. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. **Biotechnology Advances**, New York, v. 10, n. 4, p. 535-547, 1992.

REYRAT, J. M.; PELICIC, V.; GICQUEL, B.; RAPPUOLI, R. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 9, p. 4011-4017, 1998.

ROTH, D. B.; PORTER, T. N.; WILSON, J. H. Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells. **Molecular and Cell Biology**, v. 5, n. 10, p. 2599-2607, 1985.

RUVKUN, G. B.; AUSUBEL, F. M. A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. **Nature**, London, v. 289, n. 5793, p. 85-88, 1981.

SAIKA, H.; OIKAWA, A.; MATSUDA, F.; ONODERA, H.; SAITO, K.; TOKI, S. Application of gene targeting to designed mutation breeding of high-tryptophan rice. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 156, n. 3, p. 1269-1277, 2011.

SAUER, N. J.; MOZORUK, J.; MILLER, R. B.; WARBURG, Z. J.; WALKER, K. A.; BEETHAM, P. R.; SCHÖPKE, C. R.; GOCAL, G. F. Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 496-502, 2016.

SHEVCHUK, N. A.; BRYKSIN, A. V.; NUSINOVICH, Y. A.; CABELLO, F. C.; SUTHERLAND, M.; LADISCH, S. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments

simultaneously. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 1-12, 2004.

SMITH, H. H. Radiation in the production of useful mutations. **Botanical Review**, New York, v. 24, n. 1, p. 1-24, 1958 .

SMITH, H. O.; WELCOX, K. W. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 51, n. 2, p. 379-391, 1970.

SMITH, M. Site-directed mutagenesis. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 7, n. 12, p. 440-442, 1982.

SOBOLEWSKI, I.; POLSKA, K.; ZYLICZ-STACHULA, A.; JE EWSKA-FR CKOWIAK, J.; RAK, J.; SKOWRON, P. Enzymatic synthesis of long double-stranded DNA labeled with haloderivatives of nucleobases in a precisely pre-determined sequence. **BMC Biochemistry**, v. 12, n. 47, p. 1-12, 2011.

STADLER, L. J. Genetic effects of X rays in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 14, n. 1, p. 69-75, 1928a.

STADLER, L. J. Mutations in barley induced by X-rays and radium. **Science**, Washington, v. 68, p. 186-187, 1928b.

STUCKEY, S.; STORICI, F. Gene knockouts, in vivo site-directed mutagenesis and other modifications using the delitto perfetto system in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods in Enzymology**, New York, v. 533, p. 103-131, 2013.

SZTUBA-SOLINSKA, J.; RAUSCH, J. W.; SMITH, R.; MILLER, J. T.; WHITBY, D.; LE GRICE, S. F. J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus polyadenylated nuclear RNA: a structural scaffold for nuclear, cytoplasmic and viral proteins. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 6805-6821, 2017.

TERADA, R.; JOHZUKA-HISATOMI, Y.; SAITOH, M.; ASAO, H.; IIDA, S. Gene targeting by homologous recombination as a biotechnological tool for rice functional genomics. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 144, n. 2, p. 846-885, 2007.

THOMAS, K. R.; CAPECCHI, M. R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. **Cell**, Cambridge, v. 51, n. 3, p. 503-512, 1987.

TOROSER, D.; MCMICHAEL, R.; KRAUSE, K. P.; KURRECK, J.; SONNEWALD, U.; STITT, M.; HUBER, S. C. Site-directed mutagenesis of serine 158 demonstrates its role in spinach leaf sucrose-phosphate synthase modulation. **Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 407-413, 1999.

TURANLI-YILDIZ, B.; ALKIM, C.; CAKAR, Z. P. Protein engineering methods and applications. In: KAUMAYA, P. (Ed.). **Protein engineering**. Rijeka: InTech, 2012. p. 33-58.

UNGER, T.; JACOBOVITCH, Y.; DANTES, A.; BERNHEIM, R.; PELEG, Y. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 172, n. 1, p. 34-44, 2010.

VAN GENT, D. C.; HOEIJMAKERS, J. H.; KANAAR, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 2, n. 3, p. 196-206, 2001.

VITRY, C.; FINAZZI, G.; BAYMANN, F.; KALLAS, T. Analysis of the nucleus-encoded and chloroplast-targeted rieske protein by classic and site-directed mutagenesis of *Chlamydomonas*. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 10, p. 2031-2044, 1999.

WEINER, M. P.; COSTA, G. L.; SCHOETTLIN, W.; CLINE, J.; MATHUR, E.; BAUER, J. C. Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. **Gene**, Amsterdam, v. 151, n. 1/2, p. 119-123, 1994.

WEST, S. C. Molecular views of recombination proteins and their control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 4, n. 6, p. 435-445, 2003.

WILSON, T. E. Nonhomologous end-Joining: mechanisms, conservation and relationship to illegitimate recombination. In: **AGUILERA, A.; ROTHSTEIN, R. (Ed.). Molecular genetics of recombination: topics in current genetics**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. v. 17, p. 487-513.

XU, K.; STEWART, A. F.; PORTER, A. C. G. Stimulation of oligonucleotide-directed gene correction by Red β expression and MSH2 depletion in human HT1080 cells. **Molecules and Cells**, v. 38, n. 1, p. 33-39, 2015.

YANG, H.; LI, J.; SHIN, H. D.; DU, G.; LIU, L.; CHEN, J. Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future

prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, n. 1, p. 23-29, 2014.

YODER, J. I.; GOLDSBROUGH, A. P. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 12, p. 263-267, 1994.

ZHU, T.; PETERSON, D. J.; TAGLIANI, L.; CLAIR, G.; BASZCZYNSKI, C. L.; BOWEN, B. Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 15, p. 8768-8773, 1999.

